長期水旱輪作在不同施肥處理對水稻及玉米田土壤微生物多樣性及功能之研究

楊秋忠[1,*]、黃欣怡[2]、林詩耀[3]、林毓雯[4]

摘要

本研究計畫之試驗田區長期以水稻與玉米進行輪作，自 1995 年至今逾 20 年之久，田區施肥管理策略以多種處理(化肥、堆肥、綠肥、泥炭及對照組)進行逢機完全區集設計(RCBD)，在不同生長時期採集土壤分析。碳源利用測定結果顯示，堆肥加 2/3 化學氮肥處理組中慢生型微生物族群數量多於其他處理，而快生型微生物族群數量則少於其他處理，微生物活性 (AWCD) 與多樣性 (Shannon) 皆為傳統化肥處理最低。PacBio 16S rDNA 之全長定序及分析結果可觀察到，微生物之組成受到作物之影響大於處理。對照組處理的 Chao 1 值 (豐富度) 受到採樣時間點的影響較大。在玉米期時，各處理間之 Shannon 值差異較大，水稻期各處理差異較小，傳統化肥組處理之 Shannon 值隨採樣期變動最大，堆肥加 2/3 化肥組處理次之。主成分分析圖中顯示，樣品大致以作物種類分成兩大群，與親緣關係圖 UPGMA 結果相似，但玉米齊膝期時各處理微生物相之差異較大。加權後的貝塔指標顯示，對照組與堆肥添加 1/3 化肥的處理組有較高的生物多樣性。綠肥添加 1/3 化肥與泥炭添加 1/3 化肥的處理組，其生物多樣性相似度較高。細菌的種類及數量 OTU heatmap 圖顯示，栽種玉米田區的土壤樣品，其生物多樣性的相對豐度明顯高於栽種水稻的土壤。水稻及玉米產量中，對照組水稻收穫最低，化肥及堆肥加化學氮肥的處理，作物收穫有較高的趨勢且兩者產量接近；玉

[*] 通訊作者：ccyoung@mail.nchu.edu.tw
[1] 中央研究院院士、國立中興大學土壤環境科學系教授。台灣　台中市。
[2] 國立中興大學土壤環境科學系研究助理。台灣　台中市。
[3] 國立中興大學土壤環境科學系博士後研究員。台灣　台中市。
[4] 農委會農業試驗所農業化學組副研究員。台灣　台中市。

米收穫情況與水稻相似。堆肥處理之土壤，在水稻及玉米產量，皆與化肥處理無顯著差異，甚至有些年度水稻產量高過化肥處理。

關鍵詞：水稻、玉米、水旱輪作、微生物、固氮活性、微生物族群、生物多樣性、PacBio。

前言

農業生態系物質循環中土壤微生物扮演重要角色，土壤微生物參與各種養分代謝以維持土壤地力外，並與農作物生產量與品質有密切相關 (楊 2007) 。傳統研究微生物多樣性方法是觀察微生物在培養基上生長菌落的多樣性，但對未能在培養基上培養生長的微生物就無法知曉，近年來由於分子生物學的技術有顯著進展，在農業生態系土壤微生物研究中，未能培養之微生物及長期不同田間施肥管理與水旱輪作系統下對微生物群落影響之研究仍甚為缺乏，實有必要建立有效之分子生物學的技術，以便建立長期生態系微生物的多樣性之基本資料及評估。土壤中可經培養的微生物僅在 1%以下 (Atlas & Bartha 1998) ，即有大量不可培養微生物，可利用次世代定序技術 (NGS) 分析建立土壤基因型圖譜之資料，同時配合土壤理化性質、土壤固氮活性、生化反應分析碳源利用率等，可建構出土壤微生物與土壤肥力及土壤生產力之網絡關係。從土壤直接萃取微生物 DNA，經 PCR 結合次世代定序技術對細菌之 16S rRNA 基因分析微生物族群結構 (Weinstock 2012)，可瞭解受到水旱輪作栽培生態系的土壤微生物多樣性，及探討不同肥料處理對農田土壤中微生物種類之影響。

材料與方法

一、長期水旱輪作之水稻及玉米生態系田區：

長期水旱田輪作之農業生態系田區已在 1995 年 8 月開始建立至今，此栽培系統每年均依照所設計相同之處理方式，其土壤、作物、肥料及田間設計如下：

(一)土壤：

田間試驗地點於台中縣霧峰鄉行政院農委會農業試驗所之 35 號試驗田，土壤為砂頁岩非石灰性新沖積土，七塊厝系，屬壤質土壤，1995 年 8 月試驗開始時，

測定之土壤性質為：pH (1:1) 為 5.3，陽離子交換容量為 7.4 cmol kg^{-1}，交換性鉀、鈣、鎂、鋁、鋅、錳、銅及鐵分別為 74、625、149、0.23、4.3、62、4.6 與 891 mg kg^{-1}，Bray No. 1 法可萃取磷為 14.8 mg kg^{-1}。

(二) 水旱田選用相同之水稻及玉米作物品系如下：

1. 水稻 (*Oryza sativa* L., cv. TN No.67) ：台農 67 號水稻，於每年第一期栽種。
2. 玉米 (*Zea mays* L., cv. TN No.1) ：台農 1 號飼料玉米，於每年第二期栽種。

(三) 肥料：每年水旱田施用相同之肥料係依「作物施肥手冊」之推薦用量，種類及施肥量如下：

1. 水稻施用三要素肥料之 N-P_2O_5-K_2O 用量為 120-60-60 kg/ha，所使用之化學肥料分別為硫酸銨、過磷酸鈣及氯化鉀，有機資材為： (1) 豬糞堆肥、 (2) 綠肥一期水稻採用埃及三葉草、二期玉米採用田菁 (因不宜冬天生長，春作水稻只能用埃及三葉草) 及 (3) 泥炭。
2. 玉米施用三要素肥料之用量 N-P_2O_5-K_2O 為 140-80-80 kg/ha，所使用之化學肥料有尿素、過磷酸鈣與氯化鉀，有機資材為台灣農民常用之豬糞堆肥、田菁 (*Sesbania roxburghii* Merr)、埃及三葉草 (*Trifolium alexandrinum*) 及不易分解之泥炭 (peat) 。

(四) 田間設計處理：

田間處理為 7 種施肥處理 (各 4 重複) 採用 RCBD 設計，磷及鉀肥均為同量，各處理如下：

1. 對照：自然地力之對照，不施任何肥料、資材。
2. 傳統化學肥料區：以施肥手冊推薦化學肥料施用量，做為有機質肥料之相對含氮量比較。
3. 堆肥 ＋N0：有機質堆肥處理，只有堆肥之氮，不加化學 N。
4. 堆肥 ＋N1：有機質堆肥處理，即堆肥外，加化學 N 肥之 1/3 量。
5. 堆肥 ＋N2：有機質堆肥處理，即堆肥外，加化學 N 肥之 2/3 量。
6. 綠肥 ＋N1：即綠肥外 (夏季以田菁、冬季以埃及三葉草)，加 1/3 化學 N 肥。
7. 泥炭 ＋N1：即泥炭外，加化學 N 肥之 1/3 量。

二、土壤及水稻及玉米樣品採集及處理

土壤採集及分析：依水稻之分蘗期與結穗期，玉米之齊膝期與開花期各別採樣二次。每處理每重複採 5 點土樣 (表土 10 cm) 混合後裝於樣品袋中帶回實驗

室，於室溫下風乾後過篩 (2 mm 篩網) 並混合均勻，將土壤樣品放入樣品袋中保存於 4℃冰箱中待用分析 (Krsek & Wellington 1999)。

三、細菌及真菌群落結構分析

(一) 菌種培養基製備與培養條件：

分別製備細菌及真菌分離常見之 nutrient agar (NA, HiMedia) 及 potato dextrose agar (PDA, Difco)培養基，用以分離土樣之微生物。取樣品後利用無菌水進行 10 倍連續稀釋，並將稀釋液均勻塗抹於平板培養基上，於 30℃培養 3-7 天。

(二) 菌落挑選、基因型分析及菌種鑑定：

(1) 菌落挑選：於 NA 平板培養基上，將可代表各處理樣品中之可培養細菌，針對不同處理挑選菌落型態各異之菌株，菌落型態則依顏色、形狀、邊緣、皺摺等特性予以區別。

(2) 可培養菌種鑑定：將上述可代表不同處理之細菌菌株進行菌種鑑定，以瞭解其分類地位 (Shen *et al*. 2005)。本研究利用 MO BIO 公司所提供的微生物染色體 DNA 萃取套組 (UltraClean™ Microbial Genomic DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc., USA) 進行 DNA 萃取。以 16S rRNA 基因泛用性引子 1F 與 9R，利用可控溫之熱循環機進行 PCR 增殖。PCR 所得之 DNA 產物進行定序。將定序之 DNA 序列與 GenBank 等資料庫中已知菌種序列進行比對，所得結果即為菌種鑑定之依據。

(3) 利用核酸偵測法分析細菌族群多樣性：每一重複取 50 g 土壤，同處理共 4 重複 200 g 土壤混合後，去除植物殘體、石礫等雜質，加入 70 mL 無菌水，使土壤樣品呈泥漿狀，以離心球磨式粉碎均質機 (S100, Retsch®) 進行樣品均質化，離心轉速為 250 rpm、時間為 20 min。利用 MO BIO 套組萃取微生物 DNA，進行下列實驗：

a. 將抽取之土壤微生物 DNA 以 GC-4F、5R 引子進行 PCR 擴增 16S rRNA 基因片段 (產物大小介於 400–500 鹼基對)，再以變性梯度膠體電泳 (Dcode^{TM} Universal Mutation Detcetion System, Biorad, DGGE)，使用 6 % 之聚丙烯醯胺膠片，變性梯度 45–65%，以 60℃、60 V 之反應條件進行電泳 16 h。區分不同處理間的微生物族群，電泳膠片以 ErBt 染色後

以影像擷取系統拍照並以軟體 (Kodak 1D 3.5, Kodak, USA) 分析不可培養之細菌族群多樣性。

b. 土壤微生物族群高通量序列分析：本研究利用 MO BIO 公司所提供的土壤微生物染色體 DNA 萃取套組 (UltraClean™ PowerSoil DNA Isolation Kit, MO BIO Laboratories, Inc., USA) 進行採樣土壤 DNA 萃取。委託業者進行第三代定序 PacBio (Pacific Bioscience) 技術之高通量序列分析，分析序列區間為高變異區 V1-V9，序列長度約為 1500 bps，採用技術為目前坊間定序分析序列中最長的分析技術，可提供更準確的比對結果。序列資料經由 SMRTLink 整理，再用 Mothur 軟體去除嵌合體DNA，相似度97 % 以上的序列歸納為一個OTUs (Operational Taxonomic Units) 並視為同一物種，再將各 OTUs 與 GreenGenes 菌種資料庫比對獲得各樣品的物種組成資料，另以 OTUs 的數量與種類等資料進行 Alpha diversity 及 Beta diversity 等樣品間的多樣性分析。

四、土壤固氮活性及碳源利用分析

(一) 游離固氮活性測定：採用土柱管垂直插入試驗田區，採集土柱高度約 5 cm，以矽膠塞塞住土柱管底部，血清塞塞住頂部，以針筒吸取 5 mL 管內氣體，再置換入 5 mL 乙炔氣體，反應 24 h 後經氣相層析儀測定管內乙烯濃度，以乙炔還原活性代表試驗田區中土壤之游離固氮活性(Koch & Evans 1996；Hardy 1973)。

(二) 土壤碳源利用測定：每一重複取 50 g 土壤，同處理共 4 重複 200 g 土壤混合後，去除植物殘體、石礫等雜質，以均質機均質土樣，將土壤懸浮液接種至 Biolog MicroPlates 96 微孔盤後置於 30℃培養箱中培養 3 d，將反應所得之平均呈色結果以主成分分析 (principle components analysis, PCA) 軟體進行比對，將反應所得之平均呈色結果 (average well color development, AWCD) 以主成分分析 (principle components analysis, PCA) 軟體進行比對，可由碳源利用圖譜的差異性反應出微生物群落之差異。研究採樣期間使用市售套組 Biolog EcoPlate™ 系統分析田區內微生物對不同碳源的利用狀況，建立微生物群落對碳源利用之基本資料 (Harch *et al*. 1997)。此系統中已涵蓋 3

重複之設計，共包括 31 種碳源可供測試，並可將反應結果作為碳源利用之指紋圖譜。Gomez 等人在 2006 年的文獻中指出 Biolog EcoPlate™ 可以靈敏分析出短期內不同農地管理策略對 community level physiological profiles (CLPPs)的變化，而 average well-color development (AWCD) 為其討論的指標之一，其計算方式為 ΣODi/31，ODi 意旨套組 Biolog EcoPlate™中每個槽位的吸光值，此指標反映出土壤微生物在 Biolog EcoPlate™ 中對不同碳源的氧化能力，數值也可當作為微生物活性的指標；若以豐富度 R 值 (richness) 比較不同施肥處理田區中微生物碳源利用的數量，則可瞭解該施肥處理中微生物族群能利用作為養分來源的碳源數量；Shannon-Weaver index (H) 則是以土壤微生物對於碳源的可利用數量來評估該環境中土壤微生物的多樣性，計算公式表示為 –Σpi (lnPi) 。

(三) 資料整理及分析：本研究將於作物不同生育階段建立不同施肥處理下之土壤固氮活性及碳源利用資料，了解土壤固氮活性在時間及空間上之變異特性，此外以碳源利用圖譜所獲得之資訊掌握土壤微生物受到施肥處理之影響，期能藉由土壤生態功能之分析評估較佳之施肥處理方式。

結果與討論

本研究計畫之試驗田區長期以水稻與玉米進行輪作，自 1995 年至今逾 20 年之久，田區施肥管理策略以多種處理 (化肥、堆肥、綠肥、泥炭及對照組) 進行逢機完全區集設計(RCBD)，自玉米齊膝期 (MT)、開花期 (MF)、水稻分蘖期 (RT) 及水稻結穗期 (RF) 進行土壤採集分析。本計畫執行期間設計於玉米齊膝期、玉米開花期、水稻分蘖期及水稻結穗期進行土壤採樣，分析試驗田區土壤基本性質的變化，包括：pH、EC 值、有機質及有效性磷、鉀、鈣、鎂、銅、鋅等元素含量；測定田區微生物之游離固氮活性、不同種類之碳源利用情形，並進行根圈微生物之篩選、培養及純化。

田區內游離固氮活性之測定結果如表 1 所示：經比較水稻作物其根圈於 2016 年分蘖期 (灌水) 與結穗期之固氮活性後發現，化肥施用情況下快速提供作物氮

表 1. 長期水旱田輪作之土壤乙炔還原活性 (2001-2017)

			Acetylene reduction activity (nmole C_2H_4 g^{-1} soil $24hrs^{-1}$)						
Date	Crop	Stage	CK†	CF	Comp	Comp+1/3 N	Comp+2/3 N	GM+1/3 N	Peat+1/3 N
2001									
Jan.31	Maize	harvested	1.56a	1.28a	1.70a	1.39a	1.35a	1.60a	1.43a
Mar.21	Rice	27 days after planting	1.30a	1.32a	1.32a	1.38a	2.04a	1.38a	1.48a
May.1	Rice	68 days after planting	3.95abc	2.03bc	5.45ab	5.97ab	2.33bc	1.20c	6.75a
June.27	Rice	harvested	5.30a	1.75ab	3.82ab	4.53ab	1.64ab	1.04b	1.75ab
Nov.1	Maize	28days after planting	0.91a	0.86a	1.24a	0.98a	0.88a	0.84a	0.89a
Dec.12	Maize	68 days after planting	1.02ab	0.97b	1.13ab	0.99b	1.05ab	1.00b	1.19a
2002									
Jan.28	Maize	harvested	2.58a	2.01ab	2.45ab	2.20ab	2.17ab	2.40ab	1.80b
Mar.30	Rice	30 days after planting	1.04a	1.73a	1.04a	1.13a	1.25a	1.06a	0.95a
Apr.29	Rice	60 days after planting	9.94a	2.69a	8.15a	23.60a	3.00a	4.82a	21.90a
July.1	Rice	harvested	4.30a	0.68b	4.32a	2.69ab	0.75b	0.67b	2.90a
Nov.4	Maize	34 days after planting	0.42a	0.33a	0.65a	0.57a	0.42a	0.32a	0.53a
2003									
Jan.28	Maize	harvested	0.90a	0.68ab	0.80ab	0.76ab	0.74ab	0.57b	0.61ab
Apr.7	Rice	34 days after planting	0.45a	0.45a	0.62a	0.63a	1.26a	0.75a	0.46a
July.7	Rice	harvested	2.26a	1.01c	2.49ab	1.47bc	1.73bc	1.48bc	3.54a
Oct.20	Maize	33 days after planting	1.95a	1.16a	1.65a	1.91a	1.23a	1.15a	1.27a
2004									
Feb.2	Maize	harvested	1.97a	1.07b	1.30ab	0.91b	0.79b	0.70b	1.33ab
Mar.29	Rice	32days after planting	0.55a	0.80a	1.54a	1.08a	0.69a	0.88a	1.23a
June.23	Rice	harvested	1.33a	0.60a	2.17a	0.63a	0.68a	0.78a	0.79a
2005									
Feb. 16	Maize	harvested	1.23a	0.14b	0.60ab	--	--	--	--
Nov.. 7	Maize	34 days after planting	1.32a	2.12a	2.77a	--	--	--	--
2006									
Feb. 7	Maize	harvested	4.00	2.00	1.58	--	--	--	--
Mar. 30	Rice	49 days after planting	1.11a	0.99a	1.2a	--	--	--	--
Jul.3	Rice	harvested	4.24	0.20	3.30	--	--	--	--
Nov.6	Maize	36 days after planting	3.20	0.74	2.48	--	--	--	--
2007						--	--	--	--
Jan..31	Maize	harvested	0.34	0.29	0.53	--	--	--	--
Apr.10	Rice	49 days after planting	0.25	0.25	0.22	--	--	--	--
June,28	Rice	harvested	0.34	0.43	0.35	--	--	--	--
Nov.	Maize	plating	0.96a	0.03b	1.14a	--	--	--	--
2008									
Feb.	Maize	harvested	1.63a	0.04b	0.88ab	--	--	--	--
Jul.	Rice	harvested	2.56	1.75	3.68	--	--	--	--
Nov.	Maize	planting	0.91a	0.67a	0.89a	--	--	--	--
2009									
Feb.10	Maize	harvested	1.22a	0.24b	0.26b	--	--	--	--
Apr.16	Rice	tillering	1.63a	0.22b	1.35a	--	--	--	--
July.2	Rice	harvested	1.94a	0.43b	2.78abc	1.35a	0.31bc	1.05ab	0.36bc
Oct.22	Maize	planting	0.05a	0.09a	0.06a	0.05a	0.07a	0.06a	0.05a
2010									
Jan.13	Maize	harvested	0.30a	0.03b	0.12a	0.07ab	0.05b	0.05ab	0.12ab
Mar. 24	Rice	tillering	0.52b	0.73b	1.6ab	2.53a	2.16a	0.91bc	1.01b
Jan. 28	Rice	harvested	0.28ab	0.14b	0.4ab	0.63a	0.93a	0.16b	0.3ab
Oct. 27	Maize	27 days after planting	0.60b	0.61b	0.79a	0.75a	0.77a	0.61b	0.70a
2011									
July	Rice	harvested	0.9a	0.93a	1.15a	0.82a	0.97a	1.00a	1.17a
Oct.19	Maize	27 days after planting	0.23ab	0.1475b	0.275a	0.195ab	0.185ab	0.265a	0.2025ab
Nov.2	Maize	41days after planting	0.236a	0.216a	0.282a	0.283a	0.155a	0.241a	0.299a
2012									
Jan.16	Maize	harvested	0.59a	0.22b	0.20b	0.18b	0.22b	0.19b	0.16b
Apr.23	Rice	64 days after planting	3.47a	0.64b	2.09ab	2.03ab	1.01ab	0.91ab	3.18ab
Jun.8	Rice	harvested	0.17a	0.09b	0.09b	0.08b	0.07b	0.04b	0.07b
Nov.12	Maize	46 days after planting	0.42a	0.42a	0.44a	0.47a	0.42a	0.49a	0.43a
2013									
Jan.16	Maize	harvested	5.98a	0.95b	1.48b	0.88b	1.20b	0.44b	0.79b
Mar.1	Rice	45 days after planting	2.01a	1.47a	1.85a	2.07a	1.23a	1.28a	1.8a
Jun.27	Rice	harvested	1.65a	1.11a	1.64a	1.76a	0.98a	1.1a	1.45a
Oct.29	Maize	37 days after planting	0.27a	0.15abc	0.10c	0.12abc	0.04c	0.25ab	0.11bc
Dec.12	Maize	81 days after planting	0.17a	0.08b	0.10ab	0.11ab	0.12ab	0.09ab	0.08b
2014									
Apr.14	Rice	43 days after planting	0.42c	0.44bc	0.48bc	0.69a	0.53abc	0.54abc	0.62ab
May.28	Rice	87 days after planting	4.1a	0.15b	3.27a	0.51b	0.39b	0.2b	3.05a
Nov.06	Maize	44 days after planting	0.07a	0.02b	0.06ab	0.06ab	0.03ab	0.05ab	0.05ab
Dec.18	Maize	85 days after planting	0.23a	0.25a	0.17a	0.12a	0.1a	0.1a	0.05a
2015									
Apr.14	Rice	44 days after planting	0.93a	0.42a	0.95a	0.9a	1.32a	0.58a	1.5a
Jun.09	Rice	100 days after planting	0.78a	0.07b	0.73ab	0.05b	0.25ab	0.05b	0.34ab
Nov.25	Maize	55 days after planting	0.15a	0.19a	0.17a	0.21a	0.17a	0.19a	0.20a
2016									
Apr.20	Rice	40 days after planting	1.01 a	0.44 b	0.52ab	0.51 ab	0.48 b	0.51 ab	0.58 a
Jun.14	Rice	94 days after planting	0.73 a	0.89 a	0.78 a	0.38 a	0.58 a	0.46 a	0.24 a
Dec. 01	Maize	45 days after planting	0.36 a	0.06 b	0.11 b	0.04 b	0.08 b	0.07 b	0.08 b
2017									
Jan.09	Maize	84 days after planting	0.37 a	0.19 a	0.26 a	0.25 a	0.24 a	0.20 a	0.20 a
May.04	Rice	42 days after planting	0.97a	1.17a	0.98a	0.84a	1.05a	1.10a	0.71a
Jun.13	Rice	82 days after planting	1.22a	0.97a	1.14a	1.01a	1.08a	1.20a	1.15a
Nov 16	Maize	48 days after planting	1.03a	0.51a	0.67a	0.45a	0.41a	0.38a	0.68a
Dec 28	Maize	90 days after planting	0.27a	0.13a	0.20a	0.17a	0.30a	0.17a	0.18a
2018									
Apr 19	Rice	37 days after planting	0.56	0.89	0.86	0.56	0.46	0.53	0.55

肥，導致化肥處理組別的固氮活性偏低，而其他處理組別亦低於不經施肥的對照組；隨著作物生長期增長，固氮活性些微提昇，推測由於水稻作物對於銨態氮利用率高於硝酸態氮，當水田處於厭氧狀態下導致脫氮作用，促進根圈固氮活性作用。綠肥與泥炭處理由於氮素缺乏，根圈微生物處於厭氧、好氧交錯環境不利於固氮酵素的作用，導致固氮活性降低。玉米作物於齊膝期與開花期之固氮活性變化，除對照組之外均有所提昇。玉米齊膝期之乙炔還原活性範圍為 0.04-0.36 nmole C_2H_4 g^{-1} soil 24 hrs^{-1}，玉米開花期為 0.19-0.37 nmole C_2H_4 g^{-1} soil 24 hrs^{-1}，傳統化肥組之游離固氮活性皆較其他處理低，而對照組之活性皆為最高且在齊膝期與其他處理有顯著差異，而其他處理之間並無差異，但水稻分蘗期中，傳統化肥組之固氮活性為最高，顯示此組之變動較其他處理大。

土壤之理化分析結果如表 2 所示，化肥組之土壤 pH 介於 4.67-4.80 之間，為所有施肥處理中最低，而在玉米齊膝期之堆肥處理，其 pH 測值 5.94 為所有處理最高，玉米開花期則以堆肥加 1/3 化學氮肥的 5.85 為最高；土壤電導度 (EC) 以對照組之 204 及 175 μs cm^{-1} 為最低，玉米齊膝期以化肥組的 592 μs cm^{-1} 最高，玉米開花期則是泥炭土加 1/3 化學氮肥的 558 μs cm^{-1} 最高。各施肥處理的田區土壤經元素分析，結果顯示添加堆肥的三個處理，而銅含量則顯著偏低，泥炭土添加 1/3 化學氮肥處理的鈣、鎂含量為所有處理中最高，但資材分析泥炭土的鈣鎂含量並無明顯高於其他資材，推測應是有機質造成的影響。堆肥組的三個處理及泥炭 +1/3 化肥組之土壤全氮含量顯著高於其他處理，與有機質含量成正相關。

在碳源利用測定方面，表 3、表 4、表 5、表 6、表 7、表 8 及表 9 為不同施肥處理田區土壤樣品在不同孵育時間所測得及計算的 R 值、AWCD 值及 Shannon-Weaver index：玉米作物於齊膝期中，各處理的 R 值在 72 小時並無差異，但堆肥加 1/3 化學氮肥處理的 R 值在 48 小時比其他處理略低，此處理中快生型微生物族群數量可能較少，而微生物活性及多樣性均以傳統化肥組最高，但在玉米開花期中，傳統化肥組的微生物活性與多樣性皆為最低，顯示傳統化肥組的微生物族群相對不穩定。水稻分蘗期的田間處於淹水狀態，R 值比前兩次採樣低，其中堆肥加 2/3 化學氮肥處理在 48 小時的 R 值最低，但在 72 小時的 R 值最高，顯示其慢生型微生物族群數量多於其他處理，而快生型微生物族群數量則少於其他處理，微生物活性與多樣性皆為傳統化肥處理最低，綠肥加 1/3 化學氮肥處理也偏低，其餘處理差異不大。泥炭+1/3 化學氮肥組初期偏低，活性至 72 小時增長至最高，增長快速。

表 2. 土壤分析結果

(a) 2016/12/01 玉米齊膝期土壤分析

treatment	pH	EC (µs cm^{-1})	OM (%)	N (mg g^{-1})	Mehlich No.3 (mg Kg^{-1})					
					P	K	Ca	Mg	Cu	Zn
Control	5.54bc	204b	2.1	1.77	2.08a	85.97c	1123.64c	187.27b	2.16a	5.31b
Chemical	4.69e	592a	2.9	1.67	2.16a	127.65b	919.22c	127.83d	2.19a	6.24b
Compost	5.94a	383ab	3.9	1.93	1.33b	174.31a	1681.78b	169.88b	1.19b	8.84a
Compost+1/3N	5.67ab	383ab	3.7	2.14	1.43b	147.75ab	1601.69b	167.91b	1.32b	9.50a
Compost+2/3N	5.34cd	526a	4.0	2.14	1.37b	140.33b	1581.67b	163.87bc	1.16b	9.03a
GM+1/3N	5.07d	438a	3.5	1.75	2.02a	152.53ab	1061.66c	141.68cd	2.14a	5.72b
Peat+1/3N	5.13d	471a	8.0	2.37	0.88v	150.78ab	2148.71a	219.35a	0.52c	5.48b

(b) 2017/01/09 玉米開花期土壤分析

treatment	pH	EC (µs cm^{-1})	OM (%)	N (mg g^{-1})	Mehlich No.3 (mg Kg^{-1})					
					P	K	Ca	Mg	Cu	Zn
Control	5.62ab	175b	2.7	1.30	1.73a	71.38c	914.64c	200.86b	1.64a	5.3b
Chemical	4.67e	385ab	2.9	1.35	1.73a	101.46bc	738.56d	137.86d	1.67a	6.4b
Compost	5.76a	379b	3.4	1.84	0.76c	198.84a	1465.22b	179.17bc	0.51c	9.51a
Compost+1/3N	5.85a	281ab	3.4	1.84	0.76c	141.80b	1313.78b	172.64bc	0.49c	9.51a
Compost+2/3N	5.41bc	451ab	3.9	1.86	0.73c	126.99b	1290.41b	198.9c	0.45c	8.96a
GM+1/3N	5.08d	313ab	2.9	1.61	1.39b	121.81b	816.91cd	140.63d	1.26b	5.49b
Peat+1/3N	5.21cd	558a	9.5	2.45	0.2d	126.53b	2093.45a	240.32a	0d	5.24b

(c) 2017/05/04 水稻齊膝期土壤分析

treatment	pH	EC (µs cm^{-1})	OM (%)	N (mg g^{-1})	Mehlich No.3 (mg Kg^{-1})					
					P	K	Ca	Mg	Cu	Zn
Control	5.15bc	403b	2.7	1.40d	21.25b	68.81b	927.07c	174.20bc	2.55a	6.17c
Chemical	4.80d	464ab	3.3	1.47cd	32.75ab	130.89a	782.75c	141.98d	6.23a	6.66c
Compost	5.40ab	564a	3.9	1.65c	48.15a	111.06ab	1304.44b	170.84bc	1.98b	9.04b
Compost+1/3N	5.50a	536ab	3.9	1.90b	43.84a	106.54ab	1411.98b	177.65b	1.56b	10.70a
Compost+2/3N	5.40b	576a	4.2	1.90b	47.29a	102.99ab	1394.79b	183.48b	1.47b	9.31b
GM+1/3N	4.91bcd	483ab	3.5	1.53cd	33.20ab	97.47ab	864.76c	147.38cd	2.24ab	7.11c
Peat+1/3N	5.35ab	523ab	8.7	2.21a	23.18b	91.83ab	2176.34a	241.45a	0.40b	7.30c

(d) 2017/06/13 水稻結穗期土壤分析

treatment	pH	EC (µs cm^{-1})	OM (%)	N (mg g^{-1})	Mehlich No.3 (mg Kg^{-1})					
					P	K	Ca	Mg	Cu	Zn
Control	5.08b	275b	3.2	1.43c	13.03c	54.60d	919.39c	179.24bc	2.12a	7.83d
Chemical	4.76c	258b	2.9	1.40c	27.14b	59.53cd	742.14c	150.32d	2.21a	8.88cd
Compost	5.31a	320b	3.2	1.78b	45.95a	82.76a	1301.53b	176.05bc	1.14b	12.82b
Compost+1/3N	5.27ab	318b	4.3	1.89b	46.05a	81.10a	1349.37b	176.66bc	1.11b	14.79a
Compost+2/3N	5.06b	374b	4.1	1.75b	41.60a	72.69abc	1387.28b	187.48b	1.04b	13.16b
GM+1/3N	4.83c	483a	3.0	1.43c	24.61b	63.50bcd	799.47c	156.88cd	2.17a	9.36c
Peat+1/3N	5.13ab	523a	9.3	2.24a	26.34b	75.79ab	2333.34a	247.40a	0.21c	7.99cd

* Values indicated with the same letter within a row are not significantly different ($p<0.05$) by duncan

表 2. 土壤分析結果（續）

(e) 2017/11/16 玉米齊膝期土壤分析

treatment	pH	EC (μs cm^{-1})	N (mg g^{-1})	Mehlich No.3 (mg Kg^{-1})					
				P	K	Ca	Mg	Cu	Zn
Control	5.47b	185c	1.47	17e	73c	1040c	191b	1.60a	7.13b
Chemical	4.48e	716ab	1.59	35d	95bc	951c	149c	1.72a	8.07b
Compost	5.82a	317bc	1.93	69bc	133ab	1697b	188b	0.60b	11.58b
Compost+1/3N	5.31bc	801ab	2.04	94a	164a	1955b	188b	0.62b	25.79a
Compost+2/3N	5.18cd	788ab	2.25	85ab	133ab	1896b	189b	0.50b	11.88b
GM+1/3N	4.62e	580abc	1.62	37d	106bc	983c	144c	1.80a	7.90b
Peat+1/3N	5.01d	869a	2.47	64c	114b	2747a	253a	0.19b	6.75b

(f) 2017/12/28 玉米開花期土壤分析

treatment	pH	EC (μs cm^{-1})	N (mg g^{-1})	Mehlich No.3 (mg Kg^{-1})					
				P	K	Ca	Mg	Cu	Zn
Control	5.48ab	258c	1.27	44c	85c	1156d	184bc	1.32ab	7.56d
Chemical	4.66c	552abc	1.54	66ab	92c	953d	137d	1.57a	8.17c
Compost	5.63a	691ab	1.89	127a	149ab	1842bc	185bc	0.69cd	11.60b
Compost+1/3N	5.18ab	680ab	2.02	110ab	165a	1544cd	171bcd	0.97bc	11.41a
Compost+2/3N	5.23ab	910a	2.20	111ab	116bc	2234ab	205ab	0.46cd	9.61cd
GM+1/3N	4.96bc	309bc	1.53	47c	80c	893d	150cd	1.82a	7.13b
Peat+1/3N	5.41b	655abc	2.39	78bc	113bc	2629a	247a	0.27d	7.86a

* Values indicated with the same letter within a row are not significantly different ($p<0.05$) by duncan

表 3. 2016/12/01 玉米齊膝期土壤微生物經培養後的 R_{72} 值、$AWCD_{72}$ 值及 Shannon-Weaver index

(a) R_{72} 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	26	27	27	23	26	26	28
60	28	29	29	28	29	29	29
72	29	30	30	30	30	30	30

(b) $AWCD_{72}$ 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	0.6313	0.6834	0.6804	0.6160	0.6527	0.5950	0.5799
60	0.7611	0.8840	0.8751	0.7444	0.8278	0.7567	0.7578
72	0.8389	0.9822	0.9777	0.8607	0.9268	0.8852	0.8764

(c) Shannon-Weaver index

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	3.229	3.256	3.230	3.189	3.250	3.245	3.276
60	3.329	3.363	3.320	3.328	3.341	3.340	3.346
72	3.329	3.406	3.393	3.382	3.390	3.386	3.399

表 4. 2017/01/09 玉米開花期土壤微生物經培養後的 R_{72} 值、$AWCD_{72}$ 值及 Shannon-Weaver index

(a) R_{72} 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	26	25	27	28	28	28	27
60	28	29	29	29	29	29	29
72	30	30	30	30	30	30	30

(b) $AWCD_{72}$ 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	0.6613	0.6139	0.7554	0.7954	0.6714	0.6874	0.6155
60	0.7394	0.7122	0.8918	0.8616	0.7711	0.7564	0.7094
72	0.8243	0.7465	0.9726	0.9891	0.7817	0.9142	0.7900

(c) Shannon-Weaver index

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	3.203	3.237	3.259	3.280	3.286	3.274	3.289
60	3.306	3.343	3.342	3.352	3.358	3.356	3.353
72	3.392	3.386	3.397	3.406	3.408	3.399	3.404

表 5. 2017/05/04 水稻分蘗期土壤微生物經培養後的 R_{72} 值、$AWCD_{72}$ 值及 Shannon-Weaver index

(a) R_{72} 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	13	14	14	15	11	16	15
60	18	17	21	18	23	20	18
72	21	21	23	23	26	21	24

(b) $AWCD_{72}$ 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	0.2478	0.2130	0.2676	0.2945	0.2428	0.2291	0.2413
60	0.4172	0.3659	0.3774	0.4279	0.4024	0.4140	0.3999
72	0.4977	0.4754	0.5101	0.4960	0.5054	0.5300	0.5588

(c) Shannon-Weaver index

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	2.922	2.830	2.919	3.020	2.992	2.874	2.908
60	3.115	2.948	3.080	3.133	3.149	2.980	3.048
72	3.207	3.043	3.195	3.235	3.223	3.092	3.230

表 6. 2017/06/13 水稻結穗期土壤微生物經培養後的 R_{72} 值、$AWCD_{72}$ 值及 Shannon-Weaver index

(a) R_{72} 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	18	18	21	18	19	24	17
60	20	19	27	23	26	26	22
72	23	25	29	27	29	29	25

(b) $AWCD_{72}$ 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	0.2985	0.2962	0.3796	0.3873	0.4125	0.4019	0.3739
60	0.4341	0.4862	0.5569	0.5229	0.5701	0.5067	0.5766
72	0.5804	0.6433	0.7370	0.6714	0.7035	0.6669	0.6812

(c) Shannon-Weaver index

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	3.068	3.118	3.205	3.061	3.070	3.144	3.130
60	3.141	3.206	3.299	3.185	3.210	3.234	3.239
72	3.223	3.296	3.341	3.269	3.303	3.311	3.304

表 7. 2017/11/16 玉米齊膝期土壤微生物經培養後的 R_{72} 值、$AWCD_{72}$ 值及 Shannon-Weaver index

(a) R_{72} 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	29	27	27	28	24	26	27
60	31	30	30	30	29	28	30
72	31	30	30	31	31	30	30

(b) $AWCD_{72}$ 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	0.6645	0.6885	0.6383	0.7340	0.6372	0.5341	0.5449
60	0.7573	0.8804	0.8012	0.9044	0.8135	0.6219	0.6194
72	0.8993	0.9691	0.8773	0.9506	0.9131	0.7762	0.7005

(c) Shannon-Weaver index

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	3.293	3.272	3.301	3.309	3.233	3.253	3.253
60	3.378	3.366	3.370	3.352	3.326	3.327	3.341
72	3.399	3.396	3.391	3.395	3.386	3.375	3.371

表 8. 2017/12/28 玉米結穗期土壤微生物經培養後的 R_{72} 值、$AWCD_{72}$ 值及 Shannon-Weaver index

(a) R_{72} 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	26	27	26	26	23	25	26
60	29	29	29	29	25	27	29
72	31	30	30	30	30	30	31

(b) $AWCD_{72}$ 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	0.6892	0.6185	0.6269	0.5699	0.6697	0.5011	0.6801
60	0.8300	0.8307	0.8217	0.7251	0.7815	0.6646	0.7800
72	0.9758	0.9525	0.9542	0.8136	0.9043	0.7780	0.8922

(c) Shannon-Weaver index

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	3.267	3.223	3.242	3.226	3.173	3.236	3.219
60	3.344	3.342	3.340	3.329	3.271	3.320	3.343
72	3.391	3.381	3.367	3.369	3.332	3.360	3.394

表 9. 2018/04/19 玉米結穗期土壤微生物經培養後的 R_{72} 值、$AWCD_{72}$ 值及 Shannon-Weaver index

(a) R_{72} 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	23	27	24	24	27	25	27
60	28	29	28	29	30	31	30
72	30	-----	30	30	31	31	31

(b) $AWCD_{72}$ 值

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	0.5314	0.5884	0.5578	0.4987	0.5982	0.5766	0.6505
60	0.7730	0.6910	0.7788	0.7231	0.8376	0.8095	0.8842
72	0.8596	-----	0.8857	0.8650	0.8971	0.8695	0.9445

(c) Shannon-Weaver index

孵育時間 (hr)	Treatment						
	Control	CF	Compost	Compost+1/3N	Compost+2/3N	GM+1/3N	Peat+1/3N
48	3.159	3.290	3.232	3.248	3.269	3.238	3.291
60	3.315	3.344	3.327	3.347	3.364	3.355	3.360
72	3.365	-----	3.360	3.380	3.393	3.391	3.391

本研究至目前為止，已篩選、純化並定序之可培養微生物菌株共 113 株，其 16S rDNA 序列分析鑑定結果如表 10 所示，其中 98 株鑑定結果為細菌，15 株為真菌，尚有部份菌株正陸續定序分析中。以 16S rDAN 之片段序列 (經 3F 引子螢光標記定序)，利用 ClustalX 軟體進行多重序列比對 (Multiple sequence alignment, MSA) 後，再以 Mega 6.0 軟體利用 neighbour-joining (NJ) 演算法進行種系發生之樹狀圖分析，所有菌株以其來源處理為分組作圖，依照各處理

表 10. 土壤微生物經篩選純化後之菌種鑑定結果

Strain	Isolation source	Scientific name	Identity
HIH213_3F	Control	*Lapillicoccus jejuensis*	700/700(100%)
HIH214_3F	Control	*Knoellia locipacati*	692/700(98.8%)
HIH215_3F	Control	*Bacillus velezensis*	700/700(100%)
HIH216_3F	Control	*Bacillus bataviensis*	700/700(100%)
HIH217_3F	Control	*Bacillus aryabhattai*	710/710(100%)
HIH218_3F	Chemical	*Bacillus aryabhattai*	720/720(100%)
HIH219_3F	Chemical	*Bacillus pseudomycoides*	710/710(100%)
HIH220_3F	Chemical	*Bacillus wiedmannii*	730/730(100%)
HIH221_3F	Chemical	*Bacillus anthracis*	730/730(100%)
HIH222_3F	Compost	*Intrasporangium oryzae*	729/730(99.8%)
HIH223_3F	Compost	*Variovorax defluvii*	717/720(99.5%)
HIH224_3F	Compost	*Fictibacillus halophilus*	301/310(97.1%)
HIH225_3F	Compost	*Pseudomonas granadensis*	718/720(99.7%)
HIH226_3F	Compost	*Bacillus pseudomycoides*	720/720(100%)
HIH227_3F	Compost	*Bacillus megaterium*	700/700(100%)
HIH229_3F	Compost	*Pseudomonas granadensis*	707/710(99.5%)
HIH230_3F	Compost + 1/3N	*Humibacillus xanthopallidus*	698/699(99.8%)
HIH231_3F	Compost + 1/3N	*Bacillus cucumis*	698/698(100%)
HIH232_3F	Compost + 1/3N	*Bacillus aryabhattai*	700/700(100%)
HIH233_3F	Compost + 1/3N	*Bacillus aryabhattai*	700/700(100%)
HIH234_3F	Compost + 1/3N	*Bacillus pseudomycoides*	700/700(100%)
HIH235_3F	Compost + 1/3N	*Bacillus velezensis*	650/650(100%)
HIH236_3F	Compost + 1/3N	*Brevundimonas naejangsanensis*	650/650(100%)
HIH237_3F	Compost + 2/3N	*Rhodanobacter spathiphylli*	507/510(99.4%)
HIH240_3F	Compost + 2/3N	*Bacillus megaterium*	532/540(98.5%)
HIH241_3F	Compost + 2/3N	*Bacillus pseudomycoides*	598/600(99.6%)
HIH242_3F	Compost + 2/3N	*Bacillus pseudomycoides*	700/700(100%)
HIH245_3F	Compost + 2/3N	*Bacillus tequilensis*	700/700(100%)
HIH248_3F	GM + 1/3N	*Bacillus mesonae*	599/600(99.8%)
HIH250_3F	GM + 1/3N	*Bacillus pseudomycoides*	699/700(99.8%)
HIH252_3F	Peat + 1/3N	*Nocardia elegans*	700/700(100%)
HIH253_3F	Peat + 1/3N	*Bacillus mesonae*	700/700(100%)
HIH257_3F	Peat + 1/3N	*Bacillus velezensis*	700/700(100%)
HIH258_3F	Peat + 1/3N	*Bacillus pseudomycoides*	700/700(100%)
HIH279_3F	Chemical	*Microbacterium testaceum*	430/430(100%)
HIH280_3F	Chemical	*Pseudomonas geniculata*	687/688(99.8%)
HIH281_3F	Chemical	*Mycobacterium smegmatis*	500/500(100%)

表 10. 土壤微生物經篩選純化後之菌種鑑定結果 (續)

Strain	Isolation source	Scientific name	Identity
HIH282_3F	Chemical	*Rhodococcus qingshengii*	700/700(100%)
HIH283_3F	Chemical	*Pseudomonas hibiscicola*	700/700(100%)
HIH284_3F	Chemical	*Bacillus wiedmannii*	598/600(99.6%)
HIH286_3F	Compost	*Bacillus altitudinis*	649/650(99.8%)
HIH288_3F	Compost	*Bacillus wiedmannii*	700/700(100%)
HIH289_3F	Compost	*Bacillus pseudomycoides*	700/700(100%)
HIH291_3F	Compost + 1/3N	*Nocardia bhagyanarayanae*	700/700(100%)
HIH292_3F	Compost + 1/3N	*Agromyces aurantiacus*	699/699(100%)
HIH293_3F	Compost + 1/3N	*Nocardia niigatensis*	400/400(100%)
HIH294_3F	Compost + 1/3N	*Pseudomonas koreensis*	700/700(100%)
HIH316_3F	Compost	*Bacillus altitudinis*	700/700(100%)
HIH317_3F	Compost + 1/3N	*Leucobacter aridicollis*	700/700(100%)
HIH318_3F	Compost + 1/3N	*Lysobacter niastensis*	697/700(99.5%)
HIH330_3F	Control	*Pseudomonas guariconensis*	711/720(98.8%)
HIH332_3F	Compost + 1/3N	*Cellulosimicrobium funkei*	735/741(99.2%)
HIH339_3F	Compost	*Lysinibacillus xylanilyticus*	527/527(100%)
HIH340_3F	Chemical	*Bacillus altitudinis*	733/733(100%)
HIH272_3F	Control	*Bacillus wiedmannii*	700/700(100%)
HIH273_3F	Control	*Agromyces soli*	700/700(100%)
HIH274_3F	Control	*Rhodococcus qingshengii*	700/700(100%)
HIH275_3F	Control	*Stenotrophomonas maltophilia*	699/700(99.8%)
HIH276_3F	Control	*Rhodococcus qingshengii*	683/700(97.5%)
HIH277_3F	Chemical	*Bacillus pseudomycoides*	700/700(100%)
HIH278_3F	Chemical	*Bacillus pseudomycoides*	698/700(99.7%)
HIH364_NL1	Control	*Penicillium purpurogenum strain*	500/500(100%)
HIH366_NL1	Control	*Fusarium oxysporum strain: JCM 11502*	490/490(100%)
HIH367_NL1	Chemical	*Talaromyces purpureogenus*	495/500(99.0%)
HIH368_NL1	Chemical	*Trichoderma atroviride*	500/500(100%)
HIH369_NL1	Chemical	*Penicillium aculeatum*	497/500(99.4%)
HIH370_NS1	Chemical	*Canine parvovirus isolate*	444/450(99%)
HIH371_NL1	Compost	*Paecilomyces tenuis*	499/500(99.8%)
HIH372_NL1	Compost	*Ochroconis ramosa*	458/459(99.8%)
HIH373_NL1	Compost	*Talaromyces marneffei strain: R44*	499/500(99.8%)
HIH374_NL1	Compost	*Gongronella butleri strain: R21*	600/600(100%)
HIH376_NL1	Compost + 1/3 N	*Talaromyces purpureogenus*	484/501(96.6%)
HIH377_NL1	Compost + 1/3 N	*Acrophialophora levis*	500/500(100%)
HIH381_NS1	GM + 1/3 N	*Canine parvovirus isolate*	340/349(97%)
HIH383_NS1	GM + 1/3 N	*Canine parvovirus isolate*	301/311(97%)
HIH385_NS1	Peat + 1/3 N	*Canine parvovirus isolate*	389/398(98%)
HIH387_3F	Control	*Brevibacillus halotolerans*	700/700(100%)
HIH388_3F	Control	*Bacillus pseudomycoides*	700/700(100%)
HIH389_3F	Control	*Bacillus pseudomycoides*	698/700(99.7%)
HIH390_3F	Control	*Bacillus cibi*	699/700(99.8%)
HIH392_3F	Compost+1/3N	*Bacillus velezensis*	700/700(100%)
HIH393_3F	Compost+1/3N	*Bacillus pseudomycoides*	695/700(99.2%)
HIH398_3F	Chemical	*Streptomyces laculatispora*	697/700(99.5%)
HIH399_3F	Compost	*Rhodococcus qingshengii*	700/700(100%)
HIH400_3F	Compost	*Bacillus marisflavi*	700/700(100%)
HIH401_3F	Compost+1/3N	*Variovorax gossypii*	694/700(99.1%)

表 10. 土壤微生物經篩選純化後之菌種鑑定結果 (續)

Strain	Isolation source	Scientific name	Identity
HIH402_3F	Compost+1/3N	*Bacillus pseudomycoides*	697/700(99.5%)
HIH403_3F	Compost+2/3N	*Bacillus pseudomycoides*	700/700(100%)
HIH404_3F	Compost+2/3N	*Bacillus wiedmannii*	700/700(100%)
HIH405_3F	GM+1/3N	*Streptomyces cyslabdanicus*	699/700(99.8%)
HIH406_3F	Compost+1/3N	*Humibacillus xanthopallidus*	698/699(99.8%)
HIH407_3F	Compost+1/3N	*Nocardia niigatensis*	700/700(100%)
HIH408_3F	Peat+1/3N	*Bacillus luciferensis*	699/700(99.8%)
HIH409_3F	GM+1/3N	*Bacillus velezensis*	700/700(100%)
HIH410_3F	Peat+1/3N	*Bacillus luciferensis*	699/700(99.8%)
HIH411_3F	Peat+1/3N	*Paenibacillus hispanicus*	690/700(98.5%)
HIH412_3F	GM+1/3N	*Paenibacillus cineris*	697/699(99.7%)
HIH413_3F	GM+1/3N	*Bacillus velezensis*	700/700(100%)
HIH413_3F	GM+1/3N	*Bacillus siamensis*	700/700(100%)
HIH414_3F	GM+1/3N	*Bacillus cucumis*	698/698(100%)
HIH415_3F	GM+1/3N	*Bacillus megaterium*	700/700(100%)
HIH416_3F	GM+1/3N	*Bacillus altitudinis*	700/700(100%)
HIH417_3F	Compost+2/3N	*Bacillus velezensis*	700/700(100%)
HIH418_3F	Peat+1/3N	*Bacillus velezensis*	700/700(100%)
HIH419_3F	Peat+1/3N	*Micromonospora polyrhachis*	699/700(99.8%)
HIH420_3F	Compost+1/3N	*Microbacterium testaceum*	696/700(99.4%)
HIH421_3F	Peat+1/3N	*Bacillus wiedmannii*	700/700(100%)
HIH422_3F	Peat+1/3N	*Lysinibacillus fusiformis*	699/700(99.8%)
HIH423_3F	GM+1/3N	*Bacillus tequilensis*	700/700(100%)
HIH424_3F	Peat+1/3N	*Bacillus pseudomycoides*	698/700(99.7%)
HIH425_3F	GM+1/3N	*Bacillus aryabhattai*	700/700(100%)
HIH426_3F	Peat+1/3N	*Bacillus velezensis*	700/700(100%)
HIH427_3F	Peat+1/3N	*Bacillus megaterium*	699/700(99.8%)

序列量，選擇 Control、Chemical、Compost 及 Compost +1/3N 等施肥處理作圖。圖 1 顯示對照組處理所篩選出的 11 株定序菌株，大致可分成 7 個菌群；傳統化肥組的 13 株菌株，可區分成 4 個菌群；堆肥處理組的 12 株菌株，可分成 6 個菌群；堆肥處理添加 1/3 化肥組的 14 株菌株，可區分成 9 個菌群，就比例而言，堆肥處理添加 1/3 化肥組的微生物豐富度高於其他組別 (結果如圖 1 所示) 。

本研究採集 7 種試驗田區土壤總計 4 次，萃取土壤 DNA 後，7 種施肥處理的 DNA 樣品分別以代號 1~28 表示 (如表 11 所示) ，其中 1-14 為玉米作物的土壤樣品，15-28 為水稻作物的土壤樣品，將 DNA 以 GC-4F，5R 引子進行 PCR 擴增，續以變性膠體梯度電泳分離片段，擷取膠體上之條帶進行 UPGMA 分析親緣樹狀圖，結果如圖 2 所示：玉米時期樣品中 (圖 2 a) ，處理間約可分為 4 群，其中對照組 (編號 1, 8) 差異最大，傳統化肥組 (編號 2, 9) 、堆肥添加 1/3 化肥組 (編號 4, 11) 、綠肥添加 1/3 化肥組 (編號 6, 13) 及泥炭添加 1/3 化肥組 (編號 7, 14) 的

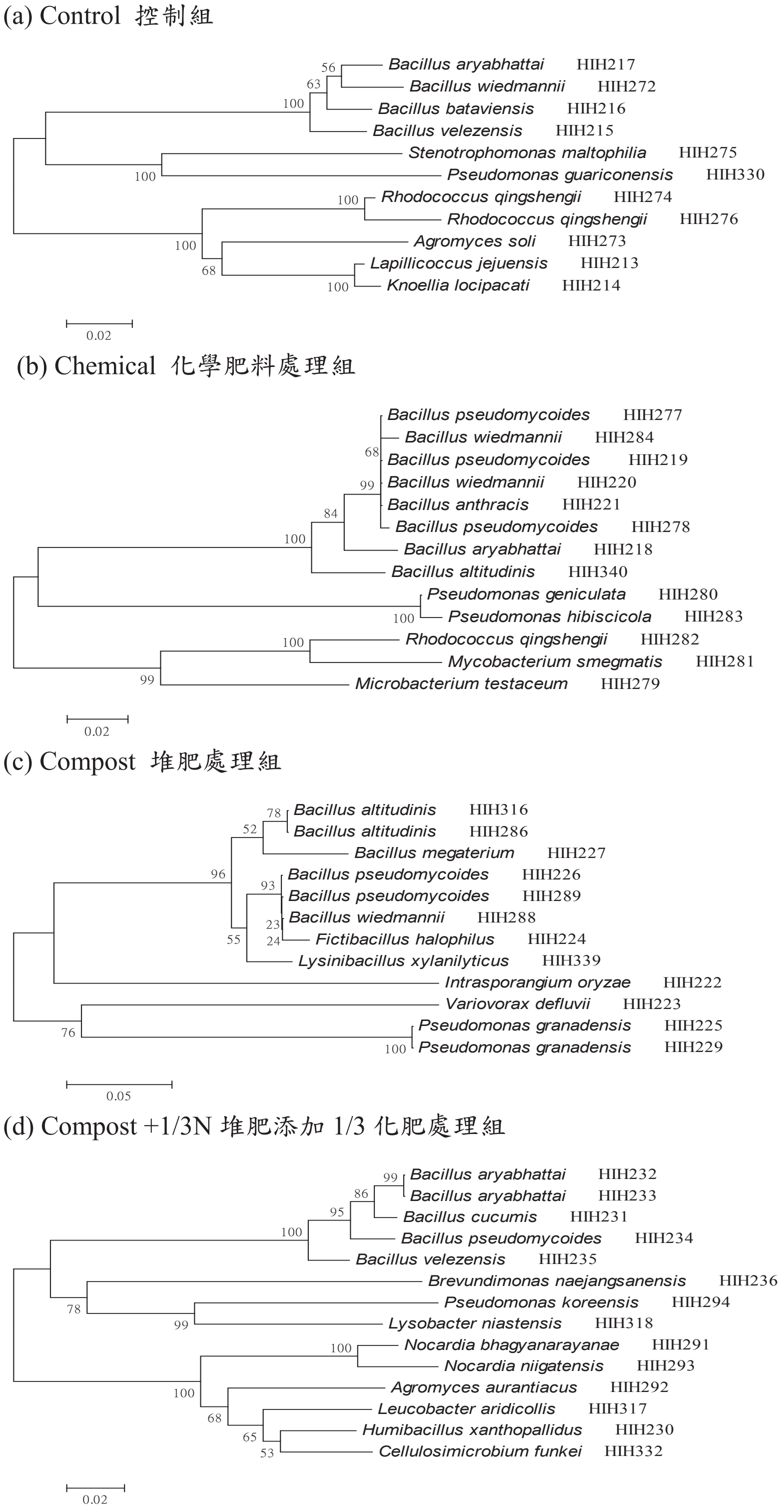
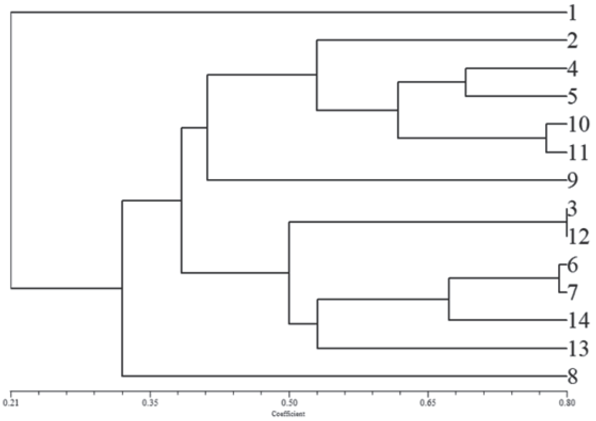


圖 1. 不同處理篩選分離菌株序列之親緣樹

種系發生較為接近。結果推論：不同施肥處理組別土壤中所分析之微生物族群結構，與其基質種類具有密切關係，即堆肥、綠肥、泥炭等不同基質分析所得的微生物族群關係呈現明顯的區集分隔；水稻時期樣品中，處理間約略亦可分為 4 群，

(a) 玉米時期樣品



(b) 水稻時期樣品

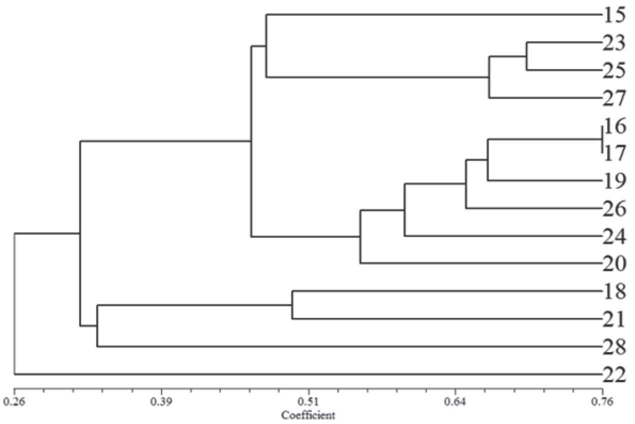


圖 2. 不同施肥處理依據 DGGE 條帶分布以 UPGMA 演算法重建之親緣關係圖。

表 11. 分析樣品其採樣時間及處理之 16S rDNA 代號

施肥處理 Treatment	採樣時間 Sampling Time			
	玉米齊膝期 20161201	玉米開花期 20170109	水稻分蘗期 20170504	水稻結穗期 20170613
Control	1	8	15	22
Chemical	2	9	16	23
Compost	3	10	17	24
Compost+1/3N	4	11	18	25
Compost+2/3N	5	12	19	26
GM+1/3N	6	13	20	27
Peat+1/3N	7	14	21	28

其中對照組 (編號 15, 22) 同樣差異最大，而堆肥組 (編號 17, 24) 、堆肥添加 2/3 化肥組 (編號 19, 26) 及泥炭添加 1/3 化肥組 (編號 21, 28) 圖譜較為接近。水稻田區厭氧環境之群落分佈關聯性較玉米田區不明顯，僅堆肥處理組各土讓樣品之微生物族群分佈較密集。

28 個土壤 DNA 樣品續以第 3 代定序之 PacBio 技術針對 16S rDNA 全長序列進行高通量序列分析，分析序列區間為高變異區 V1~V9，序列長度約為 1500 bps。序列資料經由 SMRTLink 整理，再用 Mothur 軟體去除嵌合體 DNA，相似度 97% 以上的序列歸納為一個 OTUs (Operational Taxonomic Units) 並視為同一物種，再將各 OTUs 與 GreenGenes 菌種資料庫比對獲得各樣品的物種組成資料，另以 OTUs 的數量與種類等資料進行 Alpha diversity 及 Beta diversity 等樣品間的多樣性分析。圖 3 顯示各樣品於 Phylum (門) 層級的 OTUs 組成，以此圖數據為基礎，進行 UPGMA 樹狀圖，結果如圖 4 所示，由結果可觀察到樣品之分佈大致分成 2 個群集 (少數樣品例外)，上半部多數為玉米齊膝期 (1051201) 與玉米開花期 (1060109) 樣品，下半部則多為水稻分蘗期 (1060504) 與水稻結穗期 (1060613) 樣品，顯示試驗田區土壤微生物之群落組成受到作物之影響遠大於施肥處理。圖 5 顯示各樣品於 Order (目) 層級的 OTUs 組成，結果顯示，Desulfuromonadales (除硫單胞菌目，厭氧菌) 在玉米時期所佔比例低於水稻時期；Bacillales 在玉米時期比例高於水稻時期，除了水稻分蘗期，GM+1/3N 處理此菌比例較其他處理高，比對較低層級，

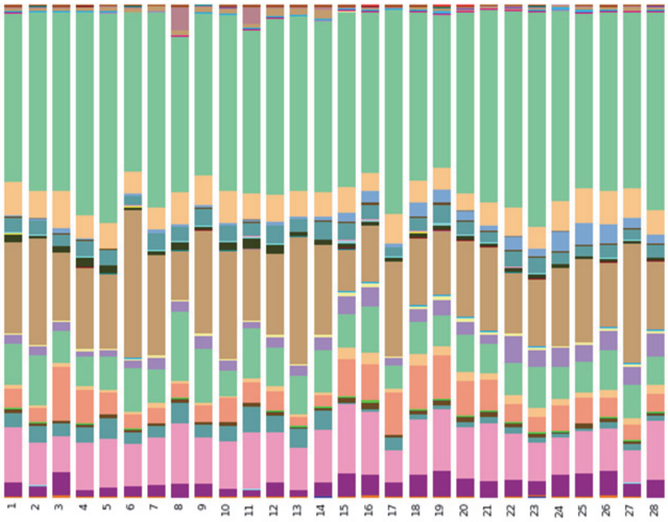


圖 3. 不同施肥處理之土壤樣品經高通量分析的 OTUs 組成結果 (細菌門 Phylum 層級)

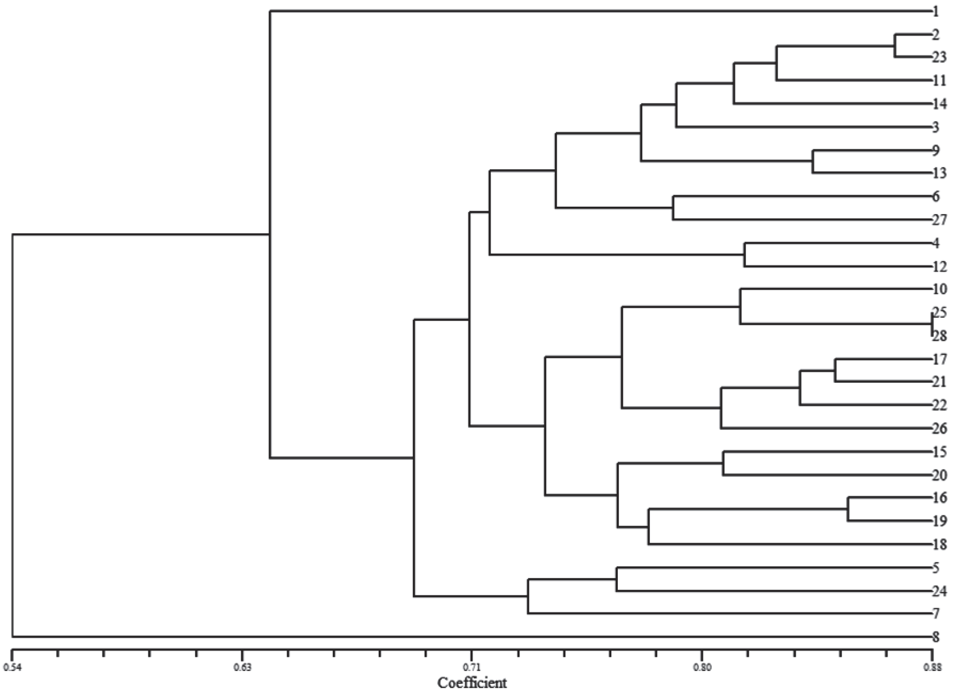


圖 4. 高通量分析的 OTUs 組成於土壤樣品間之親緣關係圖 (細菌門 Phylum 層級)

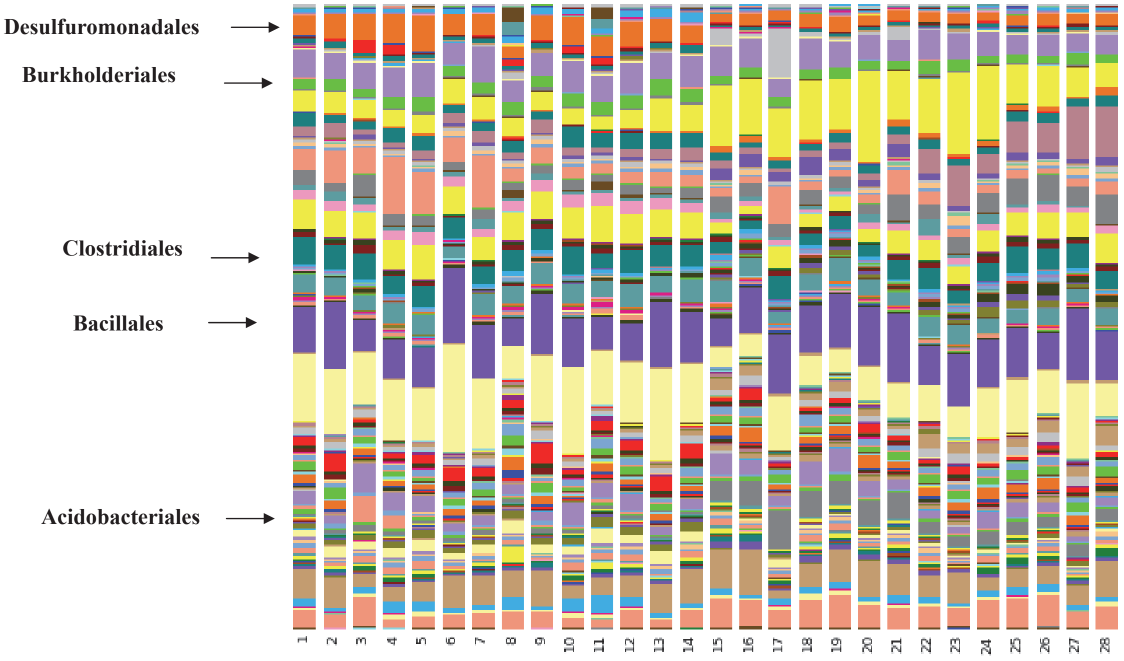


圖 5. 不同施肥處理之土壤樣品經高通量分析的 OTUs 組成結果 (細菌目 Order 層級)

主要為 *Bacillus fumarioli* 及 *flexus*；Bacteroidales (多為厭氧菌)，在玉米時期比例非常低；Acidobacteriales 嗜酸菌在 Compost 的 3 個處理中比例比其他處理低，對照 pH 結果，此 3 處理 pH 較高。

實際測得的 OTUs 數目，加上只有 1-2 條序列的 OTUs 數目形成的參數，經過 Chao 1 演算法估計樣品中應有的 OTUs 數目較能正確表達樣品狀況，結果如表 12 所示，Compost 及 Peat + 1/3N 處理的 Chao 1 值在各個採樣期波動較小，受到採樣時間點的影響較小，而 Control 處理受到採樣時間點的影響較大。OTUs 數據經由 Shannon 演算法演算出之 Shannon 值，此值演算參數中包含 OTU 數目及內含序列條帶數，可視為微生物多樣性之均勻度，如表 13 所示。在玉米期時，各處理間之 Shannon 值差異較大，水稻期各處理差異較小，Compost +1/3N 及 GM +1/3N 處理之 Shannon 值隨採樣期的變動較小，而 Chemical 處理之 Shannon 值隨採樣期變動最大，Compost +2/3N 處理次之。圖 6 為各樣品之主成分分析圖，在圖中距離愈近代表樣品中 OTUs 的種類與數量愈相似，由圖中可知，有 3 個樣品與其他樣品差異較大，分別是 #6 (玉米齊膝期，GM +1/3N 處理)、#10 (玉米開花期，Compost

表 12. 分析樣品經高通量定序分析所得 OTUs 的 Chao 1 值

施肥處理 Treatment	採樣時間 Sampling Time			
	玉米齊膝期 20161201	玉米開花期 20170109	水稻分蘗期 20170504	水稻結穗期 20170613
Control	905	1079	680	790
Chemical	744	693	808	662
Compost	770	786	818	738
Compost+1/3N	900	868	699	686
Compost+2/3N	628	868	744	683
GM+1/3N	616	635	742	660
Peat+1/3N	667	758	721	751

表 13. 分析樣品經高通量定序分析所得 OTUs 的 Shannon 值

施肥處理 Treatment	採樣時間 Sampling Time			
	玉米齊膝期 20161201	玉米開花期 20170109	水稻分蘗期 20170504	水稻結穗期 20170613
Control	7.55	7.66	7.22	7.27
Chemical	7.43	7.50	7.30	6.93
Compost	7.53	7.56	7.30	7.15
Compost+1/3N	7.57	7.76	7.35	7.25
Compost+2/3N	7.50	7.62	7.34	7.19
GM+1/3N	7.09	7.21	7.11	7.08
Peat+1/3N	7.32	7.39	7.32	7.08

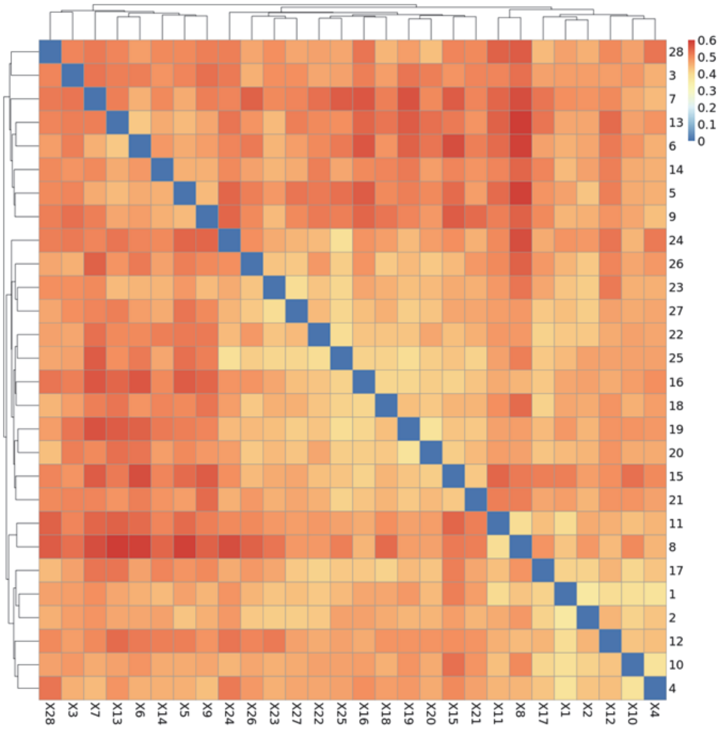


圖 6. 不同施肥處理之土壤樣品經高通量分析未加權的 Beta 多樣性指數

處理) 及 #17 (水稻分蘗期，Compost 處理)，其餘大致以作物種類分成兩大群，與 UPGMA 結果相似，但可看出玉米齊膝期樣品分散程度大於其他樣品，即在玉米齊膝期時各處理微生物相之差異較大。推測玉米作物經由化肥處理組的試驗土壤，由於化學肥料大量施用造成土壤通氣性較堆肥處理差，土壤硬化造就厭氧微生物 (如：Clostridium 等菌屬) 所適合生長之微域環境；而水稻作物由於栽培階段皆處於厭氧環境，於不同採樣點各施肥處理樣品中並無明顯的微生物族群比例差異。另，玉米作物齊膝期所施用化學肥料處理的試驗區，其微生物族群數均高於堆肥處理組；結穗期堆肥處理中的微生物族群數，於化學肥料與堆肥處理間約略相同，推測乃因化學肥料快速分解與淋洗，導致微生物可利用的養分元素快速變動進而影響 R 策略微生物族群分佈。相較於施用化學肥料的處理，堆肥處理組別的厭氧微生物較化學肥料處理組生長優勢，推測原因為有機質肥料其養分隨栽種時間緩慢性釋出，促使 K 策略微生物族群穩定分佈於環境中，本研究將高通量分析於各土壤樣品中所得比例較高的微生物資訊列於表 14 中。圖 6 及圖 7 為樣品所含微生物群落的差異，以加權及未加權之 Beta 多樣性指標表示，紅色表示差異大，加權

後可視為菌種親緣關係和豐度的綜合指標，而未加權只考慮菌種親緣進化關係。如圖所示，未加權 beta 多樣性指標同樣顯示，不同處理之間大致以作物種類進行分群。水稻田區的生物多樣性依作物生長期進行區集，處理間差異不大，而加權後的 beta 指標顯示，不同處理之間的生物多樣性雖依作物種類有分群，但相較於

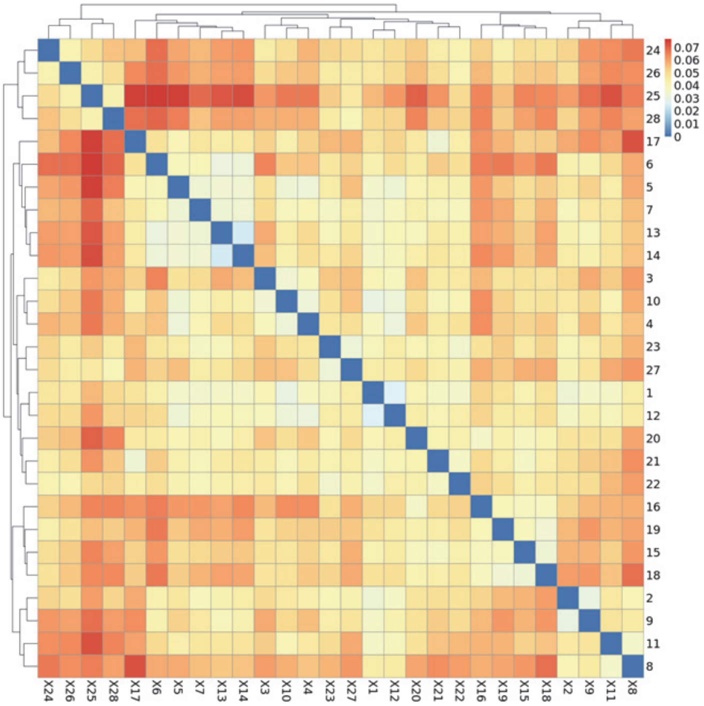


圖 7. 不同施肥處理之土壤樣品經高通量分析加權後的 Beta 多樣性指數

表 14. 土壤樣品經高通量分析所得之 OTUs 之優勢微生物比對分類層級

氧氣需求性 Oxygen requirement	生物層級 Taxonomy level	OTUs 最相似結果 Target
好氧性 (aerobic organism)	科 (family)	Chitinophagaceae
好氧性 (aerobic organism)	科 (family)	Gemmataceae
好氧性 (aerobic organism)	科 (family)	Syntrophobacteraceae
好氧性 (aerobic organism)	種 (species)	Dyella ginsengisoli
好氧性 (aerobic organism)	種 (species)	Massilia timonae
兼性厭氧 (facultative anaerobic organism)	科 (family)	Comamonadaceae
兼性厭氧 (facultative anaerobic organism)	屬 (genus)	Alicyclobacillus
兼性厭氧 (facultative anaerobic organism)	屬 (genus)	Rhodoplanes
兼性厭氧 (facultative anaerobic organism)	種 (species)	Bacillus flexus
兼性厭氧 (facultative anaerobic organism)	種 (species)	Bacillus fumarioli
厭氧性 (anaerobic organism)	科 (family)	Thermogemmatisporaceae
厭氧性 (anaerobic organism)	屬 (genus)	Clostridium
厭氧性 (anaerobic organism)	種 (species)	Clostridium butyricum
厭氧性 (anaerobic organism)	屬 (genus)	Coriobacteriaceae
厭氧性 (anaerobic organism)	屬 (genus)	Desulfosporosinus
厭氧性 (anaerobic organism)	目 (order)	Desulfuromonadales

未加權指數的結果分散，可看出對照組與堆肥添加 1/3 化肥的處理組有較高的生物多樣性。綠肥添加 1/3 化肥與泥炭添加 1/3 化肥的處理組，其生物多樣性相似度較高，與 DGGE 結果類似。圖 8 為樣品經高通量分析後以各樣品之 OTU 數目及種類所作之，OTU heatmap 圖顯示：栽種玉米田區的土壤樣品，其生物多樣性的相對豐度明顯高於栽種水稻的土壤。圖中顯示所有樣品 (X 軸) 中主要 35 屬 (Y 軸) 菌種的豐富度分佈，顏色表示每個 OTU 與該樣品中總 OTU 的百分比，藍色表示低百分比，紅色表示高分分比，玉米土壤樣品之相對豐度明顯高於水稻土壤樣品。

表 15 為各處理歷年產量記錄，產量結果顯示，水稻及玉米產量在不同年度及不同肥料處理有差異，顯示年度氣候影響不同肥料處理之效應顯著。在不施肥的土壤，水稻收穫明顯是最低的，而以化肥及堆肥加化學氮肥的處理下，作物收穫有較高的趨勢。但其收穫量都在誤差範圍內。玉米收穫情況與水稻相似，而以化肥及堆肥加化學氮肥的處理下，作物收穫有較高的趨勢。長期堆肥處理之土壤，在水稻及玉米產量，皆與化肥處理無顯著差異，甚至有些年度水稻產量高過化肥處理。

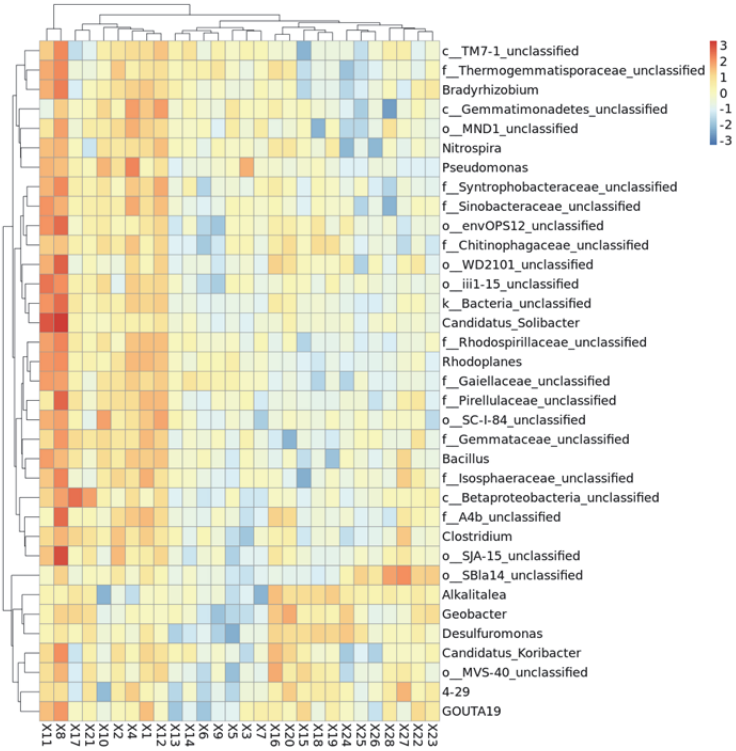


圖 8. 不同施肥處理之土壤樣品經高通量分析後之 OTUs heatmap

表 15. 35 號試驗田歷年水稻及玉米產量 (kg ha^{-1})

(a) 水稻

Treatment	Year								Average
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	
Control	4261c	3492b	4588bc	4433a	4831ab	5057d	6716c	5668b	4881
Chemical	5702a	5721a	5047c	5420a	5334ab	6320abc	8384ba	6288ab	6027
Compost	4490bc	4807a	5584ab	5216a	5107ab	5852bc	7860b	6716a	5704
Compost+1/3N	4823bc	4198a	5813a	4946a	5381ab	6600ab	8812a	6431ab	5875
Compost+2/3N	5023b	5236a	5354abc	5253a	5290ab	6881a	8479ab	6240ab	5970
GM+1/3N	4438bc	5423a	4513c	4866a	4554b	6460abc	8384ab	6240ab	5610
Peat+1/3N	4670bc	4664a	5277abc	5293a	5565a	5757cd	7764b	6050ab	5630

*Values indicated with the same letter within a row are not significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test

(b) 玉米

Treatment	Year							Average
	2010	2011	2012	2013	201 mu4	2015	2016	
Control	2357c	2117c	2083c	1568c	3518c	2628c	4154c	2632
Chemical	5348ab	5755a	4154ab	6697a	5765ab	6528ab	7715ab	5995
Compost	4977b	5180ab	4366ab	5341ab	6740a	6146ab	7757ab	5787
Compost+1/3N	5946a	6120a	5426a	6740a	6825a	6528ab	8435a	6574
Compost+2/3N	5296ab	5360ab	5087a	5977ab	6570a	6486ab	8181a	6137
GM+1/3N	5041ab	5146ab	4705ab	5553ab	4875b	7037a	8605a	5852
Peat+1/3N	4438b	4708b	3603bc	5002b	5426ab	5214b	6358b	4964

*Values indicated with the same letter within a row are not significantly different ($p<0.05$) by Duncan's multiple range test

結論

1. 有加堆肥組的 3 個處理及 Peat+1/3N 的氮含量及鈣含量皆偏高，銅含量皆偏低，推測與有機質含量有關。
2. 堆肥組 t+1/3N 處理的玉米產量與 Chemical 處理相近，堆肥組長期處理後，產量時有接近或高過化肥組處理。
3. 堆肥組及堆肥組+N 長期處理後的水稻產量與化肥組處理愈趨相近，甚至有所超越。
4. 長期施用化學肥料之土壤，乙炔還原活性較小且變動不劇烈，較不受作物生長期及環境影響，而對照組之乙炔還原活性變動最大。

5. 碳源利用測定結果顯示，化肥組處理的微生物族群相對不穩定。而堆肥組處理的豐富度、穩定度及均勻度都較高。
6. 各時期土壤樣品多源基因體的 16S rDNA 序列分析結果顯示：
   (1) 玉米開花時期樣品物種獨特性最高。
   (2) 試驗田區土壤微生物之群落組成受到作物之影響遠大於施肥處理。
   (3) 微生物均勻度，物種豐富度皆為對照組>堆肥組>化肥組。
   (4) 堆肥加化肥施用可減低單純施用化肥對土壤微生物多樣性造成的影響。
7. 化肥組及堆肥+N 肥的長期處理皆造成土壤酸化。
8. 堆肥處理之土壤，在水稻及玉米產量，皆與化肥處理無顯著差異，甚至有些年度水稻產量高過化肥處理。

引用文獻

1. Brosius, J., M. L. Palmer, P. J. Kennedy, and H. F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. 75:4801-4805.
2. Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde, and E. C. Bottger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 17:7843-7853.
3. Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, and J. W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canad. J. Microbiol. 43(10):895-914.
4. Hardy, R.W., R. C. Burns, and R. D. Holsten. 1973. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5:47-81.
5. Koch, B., and H. J. Evans. 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. Plant Physiol. 41:1748-1750.
6. Koeuth, T., L. Versalovic, and J. R. Lupski. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive Streptococcus pneumoniae box elements in diverse bacteria. Genome Res. 5:408-418.
7. Krsek, M. and E. M. H. Wellington. 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. J. Microbiol. Method. 39:1-16.
8. Lodewyck, C., J. Vaugronsveld, F. Porteous, E. R. B. Moore, S. Taghavi, M. Mezgeay, and J. L. Lelie. 2002. Endophytic bacteria and their potential application. Crit. Rev. Plant Sci.

86:583-606.
9. Mano, H. and H. Morisaki. 2008. Endophytic bacteria in the rice plant. Microbes Environ. 23:109-117.
10. Park, M., C. Kim, J. Yang, H. Lee, W. Shin, S. Kim, and T. Sa. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. Microbiol. Res. 160:127-133.
11. Saito, A., S. Ikeda, H. Ezura, and K. Minamisawa. 2007. Microbial community analysis of the phytosphere using culture-independent methodologies. Microbes Environ. 22:93-105.
12. Shen, F. T., and C. C. Young. 2005. Rapid detection and identification of the metabolically diverse genus Gordonia by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. FEMS Microbiol. Lett. 250:221-227.
13. Soeta, N., M. Terashima, M. Gotoh, S. Mori, K. Nishiyama, K. Ishioka, H. Kaneko, and T. Suzutani. 2009. An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi. J. Med. Microbiol. 58:1037-1044.
14. Sturz, A. V., B. R. Christie, J. Nowak. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 19:1-30.
15. Wicklow, D. T., S. Roth, S. T. Deyrup, and J. B. Gloer. 2005. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. Mycolog. Res. 109:610-618.
16. Lin, S.-Y., Y. C. Liu, A. Hameed, Y. H. Hsu, H. I. Huang, W. A. Lai, and C. C. Young. 2016. *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66:1453-1458.

Analysis of Soil Microbial Diversity and Function in Rice and Maize Fields under Long-term Upland and Lowland Rotational System in Different Fertilization Treatments

Chiu-Chung Young[1,*], Hsin-I Huang[2], Shih-Yao Lin[3], Yu-Weng Lin[4]

Summary

The experimental plot of this research project has been cultivated by the upland and lowland rotational system over 20 years since 1995, and the management strategy of the field fertilization has been carried out in various treatments (fertilizer, compost, green manure, peat and control group) by RCBD design. Soil sample was collected and analysed at different growth stages. The results of carbon source utilization test showed that the number of slow-growing microbial populations in Compost + 2/3N group was higher than that in other treatments, while the number of fast-growing microbial populations was less than other treatments. The microbial activity and diversity were lowest in chemical fertilizers treatment. The full-length sequencing and analysis results of PacBio 16S rDNA showed that the composition of the microorganisms was more affected by the crop than the treatment. The Chao 1 value of the Control group was greatly affected by the sampling time. In Maize, the Shannon values of the treatments

* Corresponding author, e-mail: ccyoung@mail.nchu.edu.tw

1 Professor, Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC. Academician of the Academia Sinica.

2 Researcher Assistant, Department of Soil and Environmental Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

3 Postdoctoral Researcher, Department of Soil and Environmental Science, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

4 Associate Researcher, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agriculture Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

were different, and the differences in the treatments in the rice field sample were small. The Shannon values of the Chemical fertilizer groups varied the most with the sampling time, and the Compost + 2/3N group were the second. The Principal Component Analysis shows that the samples are roughly divided into two groups according to the crop type, which is similar to the UPGMA results, but the difference in the microbial diversity of each treatment during the maize tillering period is biger. The weighted beta-diversity showed that the Control and Compost + 1/3N had higher biodiversity. GM +1/3N and Peat + 1/3N had higher similarity. The OTU heatmap shows that the relative abundance of biodiversity in the soil samples in maize is significantly higher than that in the rice. In the rice and maize yields, the Control group had the lowest production, the Chemical fertilizers and Compost +1/3N had a higher production and the yields of the two gropus were close ; the maize production was similar to rice.

Keywords: Rice, Maize, Water and drought rotation, Microbes, Nitrogen fixation activity, Microbial population, Biodiversity, PacBio.